FR

A.MENARINI diagnostics

ZENIT REAGENTS

CE

Anti-Centromère B

pour analyses de routine

Détermination quantitative des auto-anticorps contre le Centromère B dans le sérum ou le plasma

IVD | LOT Voir étiquette externe | 2°C 8°C | Σ = 96 déterminations | REF 39594

UTILISATION PREVUE

L'Anti-Centromère B est un test direct immunoenzymatique en phase solide pour la mesure quantitative des auto-anticorps de classe IgG dirigés contre le Centromère B sur sérum ou plasma. Le test est à usage diagnostic in vitro comme support dans le diagnostic du syndrome de CREST.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

La Sclérodermie Progressive Systémique (PSS) est un désordre auto-immunitaire systémique caractérisé par un épaississement et des fibroses de la peau. La PSS est un désordre du tissu conjonctif vasculaire qui entraîne une fibrose progressive et, dans la phase avancée de la maladie, la sclérose. De plus, les reins, les poumons, le cœur et les muscles peuvent aussi être touchés.

Du point de vue sérologique, la PSS est caractérisée par la mise en évidence d'anticorps anti-noyau. Jusqu'à 86% des patients atteints de sclérodermie présentent des auto-anticorps dirigés contre l'antigène Scl-70, par exemple la Topoisomérase I. Les anticorps anti-Scl-70 se retrouvent principalement chez les patients avec les manifestations les plus diffuses de la PSS (avec implication des poumons et articulations et tendance à la progression rapide).

Le syndrome de CREST est une variante de la PSS avec une durée plus longue de la maladie. Toutefois, la prévision est meilleure par rapport à celle des patients atteints uniquement de la PSS. L'acronyme CREST dérive des initiales des 5 manifestations cliniques les plus importantes: Calcinose, phénomène de Raynaud, implication de l'Oesophage, Sclérodactylie, Télangiectasie.

Chez les patients atteints du syndrome de CREST, on a retrouvé des auto-anticorps contre la protéine B du centromère. Jusqu'à 70% des patients atteints par le syndrome de CREST présentent ces anticorps. La détermination des auto-anticorps anti-Centromère B est un pronostic significatif dans le phénomène de Raynaud. Ce phénomène se présente souvent comme le premier symptôme de la Sclérodermie et précède de quelques années l'apparition des autres symptômes. Les auto-anticorps anti-Centromère B peuvent aussi être retrouvés chez les patients atteints de cirrhose biliaire primaire (PBC). PBC et CREST se superposent souvent. Les auto-anticorps anti-Centromère B ont été retrouvés chez environ 10-20% des sérums de patients atteints de PBC, en particulier chez ceux qui présentent aussi le phénomène de Raynaud et la sclérodactylie. Avec les autres protéines du Centromère (par exemple CENP-A 19 kDa, CENP-C 140 kDa), la protéine B du centromère (80 kDa) appartient à un complexe de protéines du kinétocore chromosomique qui est le point d'attache des fuseaux microtubulaires durant la division cellulaire.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

La protéine B recombinante du Centromère est adsorbée sur les micro-puits. Les anticorps dirigés contre cette protéine, s'ils sont présents dans le sérum ou le plasma dilué, se lient à l'antigène respectif. Le lavage des micro-puits enlève les composants aspécifiques non liés présents dans le sérum ou le plasma. L'antisérum du conjugué anti IgG humaines couplé à la peroxydase (HRP) révèle les anticorps liés des patients en formant un complexe conjugué/anticorps/antigène. Le lavage successif des micro-puits enlève le conjugué enzymatique non spécifiquement lié. Un substrat enzymatique en présence du conjugué lié à la phase solide est oxydé pour donner une coloration bleue. L'ajout d'un acide bloque la réaction et donne lieu à une coloration jaune finale. L'intensité de la couleur jaune est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 450 nm. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration des IgG présentes dans l'échantillon original.

3. REACTIFS, MATERIELS E EQUIPEMENT

3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

1. Standards Anti-Centromère B

5x (1 flacon= 1,2 mL, prêt à l'emploi)

STD0	REF **DCE002/09406-0**
STD1	REF **DCE002/09407-0**
STD2	REF **DCE002/09408-0**
STD3	REF **DCE002/09409-0**
STD4	REF **DCE002/09410-0**

2. Contrôles 2x (1 flacon= 1,2 mL, prêt à l'emploi)

Contrôle négatif	REF **DCE045/09401-0**
Contrôle positif	REF **DCE045/09402-0**

3. Diluant échantillon (1 bouteille, prêt à l'emploi) 100 mL REF **DCE053-0**
4. Conjugué (1 bouteille, prêt à l'emploi) 15 mL REF **DCE002/09402-0**
5. Microplaque recouverte (1 microplaque fractionnable) REF **DCE002/09403-0**
6. Substrat TMB (1 bouteille, prêt à l'emploi) 15 mL REF **DCE004-0**
7. Solution de lavage conc. (1 bouteille) 50 mL REF **DCE054-0**
8. Solution d'Arrêt (1 bouteille, prêt à l'emploi) 15 mL

Acide sulfurique 1 M	REF **DCE005-0**

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit
Eau distillée.

3.3. Matériel et équipement auxiliaire
Distributeurs automatiques capables de distribuer des volumes de 5, 100, 300 et 500 µL. Embouts à usage unique. Eprouvettes pour la dilution des sérums. Récipient de 1 L pour la dilution de la solution de lavage.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

4. AVERTISSEMENTS
- Tous les réactifs d'origine humaine utilisés pour la préparation des standards et des contrôles ont été analysés et sont non réactifs aux HIV 1 et 2 et aux anticorps HCV et Hbs Ag. Cependant, aucun test n'offre la certitude complète de l'absence de HIV, HBV, HCV ou d'autres agents infectieux. C'est pourquoi les contrôles ELISA fortement positif pour l'IgG anti-Centromère B, ELISA faiblement positif pour l'IgG anti-Centromère B et ELISA négatif doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectés.
- L'azide de sodium utilisée comme conservateur peut être toxique si ingéré ou absorbé à travers la peau ou les yeux ; de plus, il peut réagir avec les tubes en plomb ou cuivre pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Laisser couler de grandes quantités d'eau dans l'évier pour éliminer les réactifs, pour prévenir la formation d'azides.
- Le conjugué HRP contient un composé chimique venimeux/corrosif, qui peut être toxique si ingéré.
- Le Chromogène TMB contient un irritant, qui peut être dangereux si inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Pour prévenir les lésions, éviter l'inhalation, l'ingestion ou le contact avec la peau et les yeux.
- La Solution d'arrêt est constituée d'acide sulfurique dilué. L'acide sulfurique est venimeux et corrosif et peut être toxique si ingéré. Pour prévenir de possibles brûlures chimiques, éviter le contact avec la peau et avec les yeux.
- Utiliser les dispositifs de protection individuelle prévus si l'on travaille avec les réactifs fournis

5. PRECAUTIONS
- Ce kit est pour le diagnostic in vitro, à effectuer par du personnel expérimenté.
- Suivre rigoureusement la séquence des passages indiquée dans ce protocole.
- Observer les recommandations pour l'exécution du contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant les contrôles et/ou les pools de sérums.
- Tous les réactifs doivent être conservés à température contrôlée de 2-8°C dans le récipient d'origine.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents. Les dates de péremption reportées sur les étiquettes des récipients d'expédition et de tous les flacons doivent être respectées. Ne pas utiliser les composants après la date de péremption.
- Avant utilisation, laisser tous les composants des kits et les échantillons à température ambiante et mélanger soigneusement.
- Eviter le contact entre la solution tampon de peroxyde et les matériels facilement oxydables ; températures extrêmement élevées pourraient provoquer une combustion spontanée.
- Un lavage incomplet ou non soigneux et l'aspiration insuffisante du liquide des puits ELISA peuvent causer une faible précision et/ou un bruit de fond élevé.
- La fermeture incomplète de l'enveloppe refermable contenant les barrettes de puits et le matériel de dessiccation peut causer la dégradation de l'antigène avec par conséquent une faible précision des résultats.
- Une éventuelle contamination chimique du conjugué HRP suite à un mauvais nettoyage ou rinçage des appareils ou instruments peut conduire à la dégradation dans le temps du conjugué HRP. Rincer très attentivement tous les appareils et les instruments après l'utilisation de détergents chimiques.

6. CONDITIONS DE CONSERVATION
- Conserver tous les réactifs du kit à 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption s'ils sont conservés et traités en suivant les instructions fournies.
- Les barrettes des puits non utilisées doivent être replacées immédiatement dans l'enveloppe refermable contenant le matériel de dessiccation et conservées dans l'enveloppe bien fermée à 2-8°C.
- Le tampon de lavage dilué est stable pendant 1 semaine à 2-8°C.

7. PROCEDURE
Porter tous les réactifs à température ambiante (20-26 °C) et bien les mélanger.

7.1. Préparation des Standards (S_0, S_4)
A partir du moment où il n'y pas de préparation de références internationales disponibles pour les anticorps anti-Centromère B, le système de mesure est calibré en unités relatives arbitraires. Les standards ont environ les concentrations suivantes:

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4
AU/mL	0	15	30	60	240

7.2. Préparation de l'échantillon
Pour l'exécution du test, on peut utiliser des échantillons de sérum ou de plasma. Les échantillons à utiliser doivent être limpides. Il est conseillé d'éviter les contaminations dues à l'hyperlipémie, même si ces dernières n'interfèrent pas avec l'analyse. Les échantillons peuvent être conservés réfrigérés à 2-8°C pendant max 5 jours, ou bien congelés à -20°C pour 6 mois. Il est conseillé d'éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons de sérum qui pourraient conduire à une perte variable de l'activité des auto-anticorps. L'analyse d'échantillons inactivés par la chaleur est déconseillée.
Tous les échantillons de sérum doivent être dilués au 1:100 avec le diluant échantillon. Donc 10 µL de sérum peuvent être dilués avec 1000 µL de diluant échantillon.

7.3. Préparation de la solution de lavage
Diluer le contenu de chaque flacon de solution de lavage concentrée (10x) avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml. Maintenir réfrigérée: stable à 2 - 8 °C pendant au moins 30 jours après la préparation ou jusqu'à la date de péremption reportée sur l'étiquette.

7.4. Procédure
Porter tous les réactifs à température ambiante (22-28°C) pendant au moins 30 minutes.
Puisqu'il faut travailler en double, préparer deux puits pour chaque point de la courbe Standard (S_0-S_4), deux pour chaque échantillon et un pour le blanc.

Réactifs	Standard	Echantillon	Blanc
Standard S0-S4	**100 µL**		
Contrôles	**100 µL**		
Echantillon dilué		**100 µL**	
Incuber 30 minutes à température ambiante (22-28°C). Enlever le contenu de chaque puit, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Conjugué	**100 µL**	**100 µL**	
Incuber 30 minutes à température ambiante (22-28°C). Enlever le contenu de chaque puit, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Substrat TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incuber 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante (22-28°C).			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc.			

Pour éviter la contamination microbienne, il est conseillé de prélever du flacon du conjugué-HRP uniquement la quantité de conjugué nécessaire pour la réalisation du test. Ne jamais remettre le conjugué utilisé dans le flacon original.

8. CONTROLE DE QUALITE

- Les contrôles positifs pour l'IgG anti-Centromère B, et négatifs doivent être inclus chaque fois que l'on effectue un test pour s'assurer que tous les réactifs et le test fonctionnent correctement.
- Puisque les contrôles sont prédilués, ils ne représentent pas un contrôle de procédure pour les techniques de dilution utilisées pour les échantillons.
- D'autres sérums de contrôle peuvent être préparés en recueillant un pool de sérums humains, en les fractionnant et en les conservant à < -20°C.
- Pour que les résultats des tests soient considérés valides, tous les critères suivants doivent être satisfaits. Si même un seul ne rentre pas dans les valeurs spécifiées, les résultats ne pourront être considérés valables et le test devra être répété:
  - Le test est valable uniquement si la densité optique à 450 nm du contrôle positif (1) et du contrôle négatif (2) ainsi que celle des étalons (S0-S4) coïncident avec les intervalles correspondants indiqués dans le Certificat de Contrôle de Qualité inclus dans le kit.

9. CALCUL DES RESULTATS

Pour les Anti-Centromère B, il est recommandé d'utiliser les courbes log (x) / lin (y) et 4 paramètres d'ajustement. L'approximation de Spline et les coordonnées log-log peuvent également être utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser une courbe Lin-Log.

Tout d'abord, il faut calculer la moyenne des densités optiques pour chaque étalon. Utiliser une feuille de papier log/linéaire et reporter les valeurs des densités optiques de chaque étalon sur l'axe des ordonnées (axe des Y) et les valeurs des concentrations correspondantes sur l'axe des abscisses (axe des X). Dessiner la courbe qui s'approche le mieux de tous les points d'étalonnage. Les points des étalons peuvent aussi être reliés avec des segments de ligne droite. La concentration des échantillons inconnus peut être déterminée en reportant la valeur de la DO obtenue sur la courbe de calibration.

Dans une étude sur les valeurs normales effectuée avec des échantillons de sérum provenant de donneurs sains, on a déterminé les intervalles de normalité suivants avec le test anti-Centromère B:

Anti-Centromère B [AU/ml]

Cut-Off: 30

La valeur reportée ci-dessus est une valeur suggérée. Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de de référence normale, en fonction de la procédure utilisée, des contrôles, de l'appareillage et de la population de patients selon ses propres méthodes standard.
Les résultats positifs devraient être vérifiés en rapport avec l'état clinique du patient. De plus, toute décision relative à la thérapie devrait être prise individuellement.

10. LIMITATIONS DU TEST

La présence dans l'échantillon de complexes immunitaires ou d'autres agrégats d'immunoglobulines peut conduire à des réactions aspécifiques donnant des résultats faux positifs.

11. PARAMETRES CARACTERISTIQUES

11.1. Précision et reproductibilité

La précision et la reproductibilité ont été évaluées en testant huit réplications de deux échantillons positifs dans deux expériences différentes avec deux lots de kits différents.
Les opérations de distribution ont été effectuées manuellement par un opérateur.
Les résultats en terme de déviation standard et coefficient de variation sont reportés ci-après:

Echantillon	1		2	
	DS	CV%	DS	CV%
Intra-test	0.07	3.97	7.98	7.86
Inter-tests	0.08	4.41	6.28	6.12

11.2. Spécificité:

Des tests de corrélation avec un kit analogue commercial de référence, effectués sur 51 sérums (dont 6 positifs et 45 négatifs) ont montré une spécificité de 97,8%.

11.3. Sensibilité:

Des tests de corrélation avec un kit analogue commercial de référence, effectués sur 51 sérums (dont 6 positifs et 45 négatifs) ont montré une sensibilité de 83,3%.

11.4. Limites de détection:

La plus faible concentration d'anti-centromère B qui peut être distinguée par le standard zéro est d'environ <0.3 AU/mL avec limite de confiance de 98%.

12. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

BIBLIOGRAPHIE

1. Caramaschi P., Biasi D., Manzo T., Carletto A., Poli A., Bambara L.M.: Anticentromere antibody-clinical associations. A study of 44 patients. Rheumatol. Int., Vol. 14, 253-255, 1995
2. Kallenberg C.G.M.: Antitopoisomerase and anticentromere antibodies in the sclerodermatous complex. Clin. Rev. Allergy, Vol. 12, 221-235, 1994.
3. McHugh N.J., James E., Fairburn K., Maddison P.J.: Autoantibodies to mitichondrial and centromere antigens in primary biliary cyrrhosis and systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol:, Vol 18, 244-249, 1990.
4. Moroi J., Peebles C., Fritzler M.J., Steigerwald J., Tan E.M.: Autoantibody to centromere (kinetocore) in sceroderma sera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, 1627-1631, 1980.
5. Parveen S., Morshed S.A., Nishioka M.: High prevalence of antibodies to recombinant CENP-B in primary biliary cirrhosis: nuclear immunofluorescence patterns and ELISA reactivities. J. Gastroenterol. Hepatol., Vol. 10, 438-445, 1995.
6. Rother E., Peter H.H.: Progressive Systemsklerose. In: Peter H.H. und Pichler W.J. (Hrsg)., Klinische Immunologie, S. 381-390, 1006, Urban & Schwarzenberg, München.
7. Vàzquez-Abad D., Wallace S., Senècal J.L., Joyal F., Roussin A., Earnshaw W.C., Rothfield N.: Anticentromere Autoantibodies – Evaluation of an ELISA using recombinant fusion proteins CENP-B as antigen. Arthritis Rheum, Vol 37, 248-252, 1994.
8. Verheijen R.: Centromer proteins. In: Van Venrooij W.J., Maini R.N. (eds) Manula of biological marker of disease. S. B5.2:1-17, 1994, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
9. Weiner E.S., Hildebrandt S., Senècal J.L., Daniels L., Noell S., Joyal F., Roussin A., Earnshaw W, Rothfield N.: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud disease. Arthritis Rheum, Vol 34, 68-77, 1991.

SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES

ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basses)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop hautes)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

Valeurs inexplicables hors échelle

- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)

CV% intra-test élevé

- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation
- le laveur pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-test élevé

- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed 10/2009

DE *Verwendete Symbole* | EL *Επεξήγηση συμβόλων* | EN *Explanation of symbols* | ES *Explicación de los símbolos*

FR *Explication des symboles* | IT *Spiegazione dei simboli* | PT *Significado dos símbolos*

IVD	DE EL EN ES FR IT PT	In-vitro-Diagnostikum In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro diagnostic medical device Para diagnóstico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro Dispositivo di diagnostica in vitro Dispositivos médicos para diagnostico in vitro		DE EL EN ES FR IT PT	Hergestellt von Κατασκευαστής Manufacturer Fabricado por Fabriqué par Fabbricante Produzido por
REF	DE EL EN ES FR IT PT	Bestellnummer Αριθμός καταλόγου Catalogue number Número de catálogo Références du catalogue Numero di catalogo Número do catálogo	 yyyy-mm	DE EL EN ES FR IT PT	Herstellungsdatum Ημερομηνία κατασκευής Date of manufacture Fecha de producción Date de fabrication Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE EL EN ES FR IT PT	Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) Use by (last day of the month) Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE EL EN ES FR IT PT	Biogefährdung Βιολογικός κίνδυνος Biological risk Riesgo biológico Risque biologique Rischio biologico Risco biológico
 	DE EL EN ES FR IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Read instructions for use Consultar las instrucciones de uso Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE EL EN ES FR IT PT	Chargenbezeichnung Αριθμός παρτίδας Batch code Código de lote Numéro de lot Codice del lotto Lote
 Σ = xx	DE EL EN ES FR IT PT	Ausreichend für "n" Tests Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες Contents for "n" tests Contenido suficiente para "n" ensayos Contenu suffisant pour "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Conteúdo suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE EL EN ES FR IT PT	Inhalt Περιεχόμενο του κιτ Contents of kit Contenido del kit Contenu du coffret Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE EL EN ES FR IT PT	Temperaturbereich Όρια θερμοκρασίας Temperature interval Temperatura de conservación Limites de température de conservation Limiti di temperatura Intervalo de temperatura			

Manufacturer:
DiaMetra S.r.l. Headquarter:
Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI)
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufacturing site:
Via Giustozzi 35/35a
Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.
Tel. 0039-0762-24864
Fax 0039-0762-316197
E-mail: info@diametra.com

UK
UNITED KINGDOM
Distributed by
A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

AT
ÖSTEREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 11 20 Wien

PT
PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2°B
2770-203 Paço de Arcos

EL
Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ *από την*
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

FR
FRANCE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

NL
NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

ES
ESPAÑA
Distribuido por
A. Menarini Diagnosticos S.A.
Avenida del Maresme,120
08918 Badalona
Barcelona

BE
BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

DE
DEUTSCHLAND
Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics
Eine Division der Berlin-
Chemie AG
Glienicker Weg 125
12489 Berlin

IT
ITALIA
Distribuito da
A. Menarini Diagnostics
Via Lungo l'Ema, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze